

PA~~T~~NT ABSTRACTS OF J~~A~~AN

(11)Publication number :

2002-142797

(43)Date of publication of application : 21.05.2002

(51)Int.CI.

C12Q 1/06
A61K 49/00
C12M 1/34

(21)Application number : 2000-342203

(71)Applicant : NITTO DENKO CORP

(22)Date of filing : 09.11.2000

(72)Inventor : SAIGA TAKESHI

MARUYAMA KOJI

SENDA SHUJI

YAMAGUCHI NOBUYASU

NASU MASAO

(54) METHOD FOR EXAMINING MICROORGANISM ON SURFACE OF SOLID AND KIT THEREFOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide both a method for examining microorganisms with which existence of and/or the number of microbial cells of microorganisms on the surface of a solid can be simply monitored in real time and a kit for examining microorganisms used for the method.

SOLUTION: This method for examining microorganisms existing in a specimen comprises sticking an adhesive layer of an adhesive sheet for examining microorganism, having the adhesive layer consisting essentially of a water- insoluble polymer compound, to the surface of a specimen through the force of pressure, releasing the sheet, accumulating microorganisms and bringing an aqueous solution containing one or more kinds of coloring substances capable of dyeing the microorganisms to detect the microorganisms. This kit for examining microorganisms comprises the adhesive sheet for examining microorganisms and one or more kinds of the coloring substances.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-142797

(P2002-142797A)

(43)公開日 平成14年5月21日 (2002.5.21)

(51)Int.Cl.
C 12 Q 1/06
A 61 K 49/00
C 12 M 1/34

識別記号

F I
C 12 Q 1/06
A 61 K 49/00
C 12 M 1/34

ターミト[®] (参考)
4 B 0 2 9
D 4 B 0 6 3
B 4 C 0 8 5
D

審査請求 未請求 請求項の数7 OL (全6頁)

(21)出願番号

特願2000-342203 (P2000-342203)

(22)出願日

平成12年11月9日 (2000.11.9)

(71)出願人 000003964

日東電工株式会社

大阪府茨木市下轟積1丁目1番2号

(72)発明者 難賀 健

大阪府茨木市下轟積1丁目1番2号 日東
電工株式会社内

(72)発明者 丸山 幸治

大阪府茨木市下轟積1丁目1番2号 日東
電工株式会社内

(74)代理人 100080791

弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固体表面の微生物試験法およびそのためのキット

(57)【要約】

【課題】 固体表面上の微生物の存在および/またはその菌体数をリアルタイムで簡便にモニタリングすることができる微生物試験方法および当該方法に使用するための微生物試験用キットの提供。

【解決手段】 非水溶性高分子化合物を主成分となる粘着層を有する微生物試験用粘着シートの該粘着層を試験体の表面に圧着、剥離して微生物を集積した後、微生物を染色し得る1枚以上の発色性物質を含有する水溶液を該粘着層の表面に接触させることにより該微生物を検出することを含む、該試験体中に存在する微生物の試験方法。当該微生物試験用粘着シートおよび当該1枚以上の発色性物質を含む微生物試験用キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層を有する微生物試験用粘着シートの該粘着層を被験体の表面に圧着、剥離して微生物を集積した後、微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を該粘着層の表面に接触させることにより該微生物を検出することを含む、該被験体中に存在する微生物の試験方法。

【請求項2】 発色性物質を含有する水溶液を通過しないことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 発色性物質が蛍光材料である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 微生物試験用粘着シートの粘着層表面の平滑度が $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下である請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層を有する微生物試験用粘着シート、および微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を含む微生物試験用キット。

【請求項6】 発色性物質が蛍光材料である請求項5記載のキット。

【請求項7】 微生物試験用粘着シートの粘着層表面の平滑度が $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下である請求項5または6記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規な微生物試験法に関する。より詳細には、本発明は、粘着層を用いて微生物を捕集し、捕集した微生物を染色することにより該微生物を検出する、微生物試験法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、被験面上に存在する肉眼では観察することのできない細菌等の微生物を観察および計数するには、培養法、すなわち、寒天などで賦形した固形の平板培地を被験面に押し当てるにより、被験面上の微生物を平板培地上に転写し、該微生物をそのまま平板培地上で至適環境下に培養することにより出現するコロニーを肉眼または真体顕微鏡等で見定めながら計測する方法が一般的に利用されている。例えば、フードスタンプ（日本製薬（株）製）を使用したアガースタンド法等が挙げられる。

【0003】また、微生物捕捉能力のあるメンブレンフィルタ等を用いるメンブレンフィルタ法は、被験面を生卵食塩水やリン酸緩衝液等を用いて十分に拭き取りながら集積することにより微生物を洗い出し、この洗い出した集積液をメンブレンフィルタで濾過することによって、メンブレンフィルタ上に微生物を捕集した後、微生物と液体培地とを十分に接触させて該フィルタ上にコロニーを形成させ、コロニー数を計測する方法である。メンブレンフィルタ法はまた、フィルタ上に捕集された微生物を含有する水溶液を該粘着層の表面に接触させることにより該粘着層を被験体の表面に圧着、剥離して微生物を集積した後、微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を該粘着層の表面に接触させることにより該微生物を検出することを含む、該被験体中に存在する微生物の試験方法。

物を適当な染色液と接触させて、発色した菌体数を顕微鏡等で計数することにより、培養を行わずに微生物を検出する方法としても利用することができる。

【0004】しかしながら、アガースタンド法等では、通常、一つの被験面に対して一度しか使用できないので、寒天培地の含水率によって捕集効率が変化し、再現性に劣るなど、微生物の捕集効率において不都合を来たす場合があった。また、培養法の共通の課題として、微生物間のコンタミネーションが起こり、培地上での微生物間の相互作用により純粋培養ができないために、その後の判定に不都合を来たす場合があった。加えて、培養法では当然のことながら、生菌のみに限定されるという制約があり、検出もれが起こるという問題があった。さらに、培養法では1～2日またはそれ以上の培養時間を必要とするので、リアルタイムでの微生物モニタリングができないという重大な制約があった。

【0005】また、メンブレンフィルタ法では、被験体が水溶液等の液状物であればそのまま通過できるが、非液状の被験体では、綿棒でのサンプリング、洗い出し液の調製などを含め微生物の集積に多大な労力がかかるという欠点があった。さらに、洗い出しおよび濾過操作により微生物以外の捕集物が影響して、後の観察・測定の妨げになるという問題もあった。

【0006】最近では、微生物細胞内のATP（アデノシン三リン酸）を検出する技術も開発されているが、これも水に分散した微生物に対象が限られており、やはり集菌法の煩雑さが課題であった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、上記従来法の諸欠点を解消した新規な微生物試験方法、特に、固体表面上の微生物の存在および/またはその菌体数をリアルタイムで簡便にモニタリングすることができる微生物試験方法を提供することである。また、本発明の別の目的は、当該方法に使用するための微生物試験用キットを提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層を有する微生物試験用粘着シートを被験体である固体の表面に圧着、剥離して微生物を集積した後、微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を該粘着層の表面に接触させ、染色された菌体を観察・計数することにより、迅速且つ簡便に固体表面上の微生物を検出することに成功して本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明は、非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層を有する微生物試験用粘着シートの該粘着層を被験体の表面に圧着、剥離して微生物を集積した後、微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を該粘着層の表面に接触させるこ

とにより該微生物を検出することを含む、該被験体中に存在する微生物の試験方法である。

【0010】本発明の方法は、粘着シートの粘着層の裏面（以下、粘着面ともいう）上に捕獲、集積された微生物を、培養することなく該粘着面に保持したまま発色性物質により発色させるため、肉眼による目視判定又は顕微鏡もしくは光学機器を用いて発色状態や発色度を観察することにより、細菌、真菌、ウイルスなどの微生物を、リアルタイムで検出および／または計数することができる。

【0011】本発明はまた、本発明の微生物試験方法を簡便且つ迅速に実施するのに適した微生物試験用キットを提供する。したがって、別の本発明は、非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層を有する微生物試験用粘着シート、および微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を含む微生物試験用キットである。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明に使用する微生物試験用粘着シートは、非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層が基材上に網層された構造を有する。該粘着層は、板面上の微生物を捕獲するに十分な粘着性を有するとともに、微生物染色用の水溶液に浸しても粘着剤が溶解しないことを特徴とする、平滑な表面構造を有する層である。

【0013】当該粘着シートは、基材の粘着層と接する面とは反対面に、基材の強度を上げたり、光学的な散乱防止や発色性物質を用いて発色した微生物の視認性向上させるバックグランド色を形成するために、さらにパッキング層を設けても良い。

【0014】微生物試験用粘着シートの基材は、非水溶性で、粘着層表面に大きな凹凸を形成させず、また、曲面や狭所表面にも自在に圧着させ得る柔軟な材質であれば特に限定されないが、ポリエステル、ポリエチレン、ポリウレタン、塩化ビニル、布、不織布、紙、ポリエチレンラミネート紙等が例示される。中でも、平滑なポリエステル、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリウレタンが基材として望ましい。また、基材の厚みは、支持体として十分な強度があれば特に制限はないが、約5～200μm程度が好ましい。

【0015】粘着層の粘着剤は、被験面上の微生物を捕獲でき得る粘着性を有し、水溶液に溶解しなければ特に限定されず、例えば、天然ゴム、合成ゴム、シリコーン系粘着剤、あるいはポリアクリル酸系高分子化合物、ポリアクリル酸塩系高分子化合物、エチレン酢酸共重合物、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステルなどの高分子化合物が挙げられ、2種以上の化合物の混合物や共重合体であっても良い。これらの高分子化合物の製造は、それぞれ既知の方法で行うことができる。例えば、ポリアクリル酸系高分子化合物は、液重合、乳化重合、

懸滴重合、塊状重合、光重合などいずれの方法で製造しても良い。また、必要に応じて、粘着付与剤、老化防止剤、架橋剤、充填剤など、常用の添加剤をこれらの高分子化合物に配合することができる。

【0016】また、捕獲した微生物を顕微鏡などで計測するに際しては、粘着層表面に集積した微生物に焦点を合わせたため、その表面の平滑度（凸凹差）は20μm以下であることが好ましい。平滑度が20μm以下であれば、顕微鏡の焦点の台数範囲が広くなり、計数が容易となる。平滑度は表面粗さ計あるいは電子顕微鏡などで微生物試験用粘着シートの断面を観察し、粘着層表面の凸部の頂点から凹部の最低点までの高度差を測定して求めることができる。

【0017】本発明に使用する微生物試験用粘着シートは、自体既知の方法で製造される。例えば、粘着層に用いる高分子化合物を含有する溶液を基材上に塗布し、室温から200°Cで乾燥させることによって製造される。他に、カレンダー法、キャスティング法や押出し成形法などの方法を用いることもできる。かくして得られたシートは任意の形状に裁断して、使用することができる。

【0018】本発明においては、微生物試験用粘着シートを電子線あるいはγ線などの放射線を照射することにより、滅菌することと同時に粘着層に用いる高分子化合物に架橋を施すこともできる。また、エチレンオキサイドなどのガスによる滅菌を施すこともでき、滅菌した状態で微生物遮断性包材に封入することなどにより、無菌状態を保持した形態をとることができる。

【0019】本発明の微生物試験方法について説明する。試験対象となる微生物には、細菌や放線菌などの原核生物、酵母やカビなどの真核生物、下等藻類、ウイルス、動植物の培養細胞などが含まれる。

【0020】微生物試験用粘着シートを床、壁などの被験面に圧着して、被験面上に付着している微生物を効率的に転写、集積する。比較的微生物が少ないと考えられる被験面を圧着する場合は、該粘着シートの同一面で複数回圧着しても良い。本発明の方法は、アガースタンプ法のように培養を必要としないので、コロニーのコンタミネーションの心配がなく、培養時における菌相の変化を懸念することもないことから、多重に微生物を集積することができる。したがって、圧着回数を増やすことにより、メンブレンフィルタ法において水に分散した微生物を通過・濃縮するのと同様に、多くの微生物を捕集することができる。

【0021】次に、微生物を集積した該粘着シートを必要に応じて所定の大きさに切断し、微生物を集積した面を、発色性物質を含有する水溶液に浸して、微生物を染色する。余剰な発色性物質を除去する必要があれば、無菌水などで微生物を集積した面を綿いで洗浄する。また、微生物を染色後に微生物を集積した面を乾燥する必要がある場合は、風乾、自然乾燥、減圧乾燥などにより

乾燥することができる。これを顕微鏡観察することにより、特に発色性物質が螢光染料の場合は、励起光下で顕微鏡観察することにより、検出機能が付与され、微生物を直接カウントすることができる。本発明によれば、培養操作を要さないので、数分以内に微生物を検出できる。

【0022】本発明に用いられる発色性物質は、検査対象である微生物に含まれる細胞成分と作用して発色するものであれば特に限定されないが、その代表的なものとして、核酸やタンパク質を染色する蛍光染色液が挙げられる。さらに具体的な発色性染料としては、微生物一般を対象とする場合は、蛍光性核酸塩基類似体、核酸を染色する蛍光染色剤、タンパク質を染色する染色液、タンパク質などの構造解析に用いられる環境性蛍光プローブ、細胞膜や膜電位の解析に用いられる染色液、蛍光抗体の標識に用いられる染色液などが、好気性細菌を対象とする場合は細胞の呼吸によって発色する染色液などが、真核微生物を対象とする場合はミトコンドリアを染色する染色液、ゴルジ体を染色する染色液、小胞体を染色する染色液、細胞内エステラーゼと反応する染色液及びその修飾化合物などが、高等動物細胞を対象とする場合は骨組織の観察に用いられる染色液、神経細胞トレーザーである染色液などが挙げられ、これらは蛍光顕微鏡で観察できる。

【0023】これらの発色性物質の種類を選択することによって、すべての微生物を検出する全菌数測定、呼吸活性を持つ微生物のみを染色し計数する検定、エステラーゼ活性を持つ微生物のみを染色し計数する検定、あるいは複数の発色性物質を組み合わせた二重染色法を用いることによる特定の属や種の微生物を染色し計数する検定など、幅広い分野への適用が可能である。

【0024】微生物の検出または計数は、肉眼による目視判定により、あるいは光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、レーザー顕微鏡などの顕微鏡もしくは他の適当な光学機器を用いて光学的画像を形成させ、この像を画像解析することにより行うことができる。他の光学機器としては、微生物をレーザー光で高速スキャニングし、個々の微生物から得られたシグナルをグラフィカル表示するレーザースキャニングサイトメーターが例示される。本発明は、培養操作を要さないので、実質的に該粘着シートの粘着面上の微生物は、数分～十数分以内に検出できる。

【0025】本発明はまた、上記の微生物試験方法に使用するための微生物試験用キットを提供する。本発明の微生物試験用キットは、非水溶性高分子化合物を主成分としてなる粘着層を有する微生物試験用粘着シートと、微生物を染色し得る1種以上の発色性物質を含有する水溶液を含む。微生物試験用シートおよび発色性物質としては、それぞれ上記本発明の方法において例示したと同様のものを使用することができる。

【0026】本発明の応用例の一例として、粘着面を被

表面に貼付して、被膜面上に存在する微生物を転写し、前培養なしで微生物を染色し、微生物をシングルセルのまま観察できるので、該試験体の清潔度を迅速に測定する環境調査用などに利用できる。さらに、シングルセルレベルでの回収があるので、該粘着シートを該表面に複数回押すことで微生物を集積し、濃縮することも可能であり実用的である。応用分野として、医療、食品などの現場での環境の微生物検査などに適用できる。

【0027】

19 【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明の範囲を何ら限定するものではない。

【0028】実施例1

1) 微生物試験用粘着シートの作製

アクリル酸2エチルヘキシル	7.0	直層部
エトキシエチルアクリレート	2.5	直層部
アクリル酸	5	直層部
酢酸エチル	15.0	直層部
アゾイソブチロニトリル	0.3	直層部

20 上記成分を直層反応容器内に仕込み、反応容器内を窒素置換しながら攪拌を行った。その後、内浴温度を55～65℃に保持し、約10時間直層を行った。次いで、内浴温度を70℃に上昇させて約2時間攪拌を続けた。得られた共直層物のガラス転移温度は212Kであり、ゲル分率は31.5%であった。次に、この粘着剤を表面シリコーン処理した剥離紙に乾燥後の厚みが2.0μmになるように塗布し、130℃で5分間乾燥した。この粘着剤を含む剥離紙の粘着剤面に、片面コロナ処理を施した厚み7.5μmのポリエチルフィルムを貼付圧着して、有効粘着面が約10cm²になるように裁断した。

【0029】2) 計測

ブドウ球菌培養液を無菌のリン酸緩衝液で希釈した液4μlをプラスチックなどの表面に滴下し自然乾燥した面を被験物とした。剥離紙を剥がした粘着シートで被験物に対し3回圧着、剥離を繰り返し、ブドウ球菌を集積した。次に、菌を集積した粘着面を、滅菌脱イオン水で1万倍に希釈したSYBR Green II (SYBR Green II RNA Gel Stain, Molecular Probes Inc.製) を滴下した後自然乾燥し、490nmの励起波長の蛍光顕微鏡(倍率1,000倍)を用いて緑色に染色された菌数を測定した。結果を比較例1とともに表1に示す。拭き取りーメンブレンフィルタ法に比べて、同等以上の菌を検出した。

【0030】比較例1

本発明の比較例として、拭き取りーメンブレンフィルタ法を行った。実施例1の2)と同じ培養液から同様に作製した被験物を、拭き取り法、すなわち滅菌含水綿棒(商品名:ふきふきチェック、栄研器材製)で拭き取り、滅菌生理食塩水に懸濁した。次に、1万倍希釈となるようにSYBR Green IIを加えて15分染色後、孔径0.2μmのポリカーボネート製フィルタで懸濁液を遠

過して染色した菌をフィルタ上に捕獲し、自然乾燥後に実施例と同様に菌数を測定した。結果を実施例1とともに表1に示す。

* 【0031】
【表1】

*

被験物	供試菌数	粘着シート (実施例1)	拭き取り-メンブレン 法(比較例1)
プラスチック表面	6.0×10^5 cells	3.2×10^5 cells	2.0×10^5 cells
木製机表面	未計測	1.8×10^5 cells/mm ²	2.6×10^5 cells/mm ²
プラスチック表面	未計測	1.3×10^5 cells/mm ²	4.8×10^5 cells/mm ²

【0032】実施例2

身の回りの物を被験物として、菌を人為的に添加することなく自然環境中における微生物数を測定した。被験物の条件以外は実施例1の2)と同様にして、被験物表面の菌を集積、染色、測定した。結果を表2に示す。拭き取り-メンブレンフィルタ法に比べて、同等以上の菌を検出した。

【0033】比較例2

10※実施例2と同じ被験物を比較例1と同様にして、被験物表面の菌を拭き取り、染色、通過して測定した。結果を表2に示す。菌数には差れないが、拭き取り-メンブレンフィルタ法では菌以外に水分で膨潤した手垢なども捕集されたため、測定の際、観察しづらかった。

【0034】
【表2】

※

被験物	粘着シート (実施例2)	拭き取り-メンブレン 法(比較例2)
ロッカーの金属扉	1.4×10^5 cells/mm ²	3.0×10^5 cells/mm ²
クーラーボックスの蓋	6.0×10^5 cells/mm ²	4.0×10^5 cells/mm ²
木製ドア	1.2×10^5 cells/mm ²	9.5×10^5 cells/mm ²

【0035】実施例3

ブドウ球菌を用いて、本発明による生菌数測定を行った。実施例1の2)と同様に作製した被験物の表面のブドウ球菌を、粘着シートに集積した。次に、菌を集積した粘着面に $150 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した6-carboxyfluorescein diacetate (Sigma社製、以下6-CFDAと略す) を滴下し、自然乾燥後、実施例1の2)と同様に茎★30【表3】

★光頭微鏡を用いて緑色の蛍光を発する菌数を測定した。その結果を、実施例1と同じSYBR Green IIで染色し菌数を測定した結果とともに、表3に示す。エステラーゼ活性を有する細菌を十数分で検出でき、SYBR Green IIで求めた全菌数のおよそ60~95%であった。

【0036】

被験物	供試菌数	6-CFDA染色	SYBR Green II染色
プラスチック表面	6.0×10^5 cells	2.0×10^5 cells	3.2×10^5 cells
プラスチック表面	8.4×10^5 cells	1.0×10^6 cells	1.3×10^6 cells
プラスチック表面	4.6×10^5 cells	8.0×10^4 cells	9.4×10^4 cells

【0037】

【発明の効果】本発明によれば、培養や洗い出し液の複雑な操作を行わずに固体表面上の微生物を効率よく捕集する

☆することができ、リアルタイムで簡便に捕集した微生物を検出および/または計数することができる。

フロントページの続き

(72)発明者 千田 緒治
大阪府茨木市下猪飼1丁目1番2号 日京
電工株式会社内
(72)発明者 山口 道康
大阪府茨木市上猪飼4丁目9番3号

(72)発明者 那須 正六
大阪府大阪市都島区都島本通3丁目15番9
号

F ターム(参考) 4B029 AA03 AA07 AA08 AA09 BB02
CC07 EA16 FA01 FA11 GA08
GB09 HA06 HA10
4B053 QA01 QA18 QQ06 QQ16 QR56
QR69 QR84 QS10 QS39 QX02
4C085 JJ12 KA23 KB37 KB99 LL20